

รหัสโครงการ SUT3-303-52-24-24



รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง
(Cryopreservation of Giant barb, *Catlocarpio siamensis* sperm)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of Giant barb, *Catlocarpio siamensis* sperm)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. นายเดชา รอดระรัง
2. นายอาคม ชุ่มธิ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2552
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

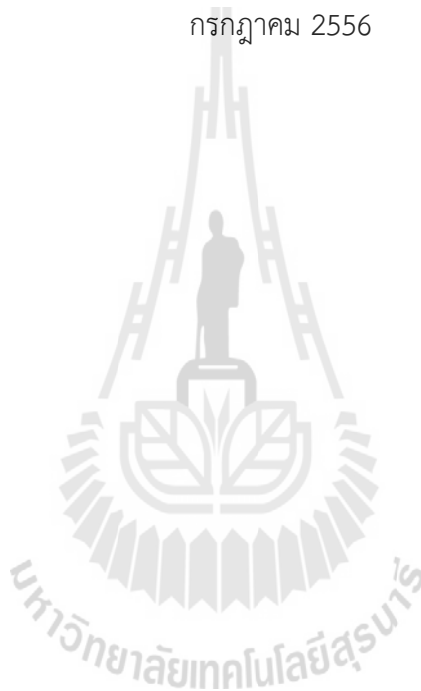
กรกฎาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบพระคุณ นายอรรถพร อัมศิลป์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดหนองคาย ที่ช่วยประสานหาแหล่งพ่อแม่พันธุ์ปลาสำหรับงานวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณ บุคลากรพนักงานของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลำปาง และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น ทุกๆท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2556



บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองดังนี้ 1) ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้แบบแช่แข็ง 2) ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้แบบแช่แข็ง และ 3) ผลของขนาดและภาชนะบรรจุ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้แบบแช่แข็ง

สำหรับการทดลองที่ 1 มีการใช้สาร extenders 2 ชนิด (Hanks' balanced salt solution-HBSS, และ modified cortland solution-MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA และ propylene glycol- PG) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10% สำหรับ DMSO และ DMA และที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% สำหรับ PG เก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปประเมินคุณภาพจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ MC ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ ($P < 0.05$) อีกทั้งยังให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด สำหรับการใช้น้ำเชื้อ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างไรก็ตามการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ให้อัตราการปฏิสนธิสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีการใช้น้ำเชื้อ DMA เป็นสาร cryoprotectant สำหรับการใช้น้ำเชื้อ PG ให้ผลอัตราการปฏิสนธิต่ำในทุกทรีตเมนต์ การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้แบบแช่แข็ง โดยเลือกสาร extender และ cryoprotectant ที่ให้อัตราการปฏิสนธิดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ (-40, -60 และ -80 °C) พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ MC ให้อัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 10% DMA ร่วมกับ HBSS ($P < 0.05$) และในการทดลองที่ 3 ศึกษาผลของขนาดและภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีแช่แข็งโดยการนำทรีตเมนต์ที่ให้อัตราการปฏิสนธิดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ณ จุด end point -40 °C มาทำการศึกษขนาดของภาชนะบรรจุ 5 ขนาด คือ (0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิลิตร) พบว่าการใช้ภาชนะบรรจุแบบ Straw ขนาด 0.25, 0.5 และ 1 ml และการใช้ cryovial ขนาด 2 และ 5 ml ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ ($P > 0.05$)

ABSTRACT

This present study examined the feasibility of cryopreservation of Giant barb, *Catlocarpio siamensis* sperm. Three major experiments were carried out: 1) the effects of extenders and cryoprotectants 2) the effects of freezing rates and 3) the effect of sizes and types of containers on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm were investigated.

In the first experiment, effect of two extenders (Hanks' balanced salt solution-HBSS and modified cortland solution-MC) with three cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA and propylene glycol- PG) at concentration of 5, 7.5 และ 10% for DMSO and DMA, and 10, 15, 20% for PG on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm were investigated. Sperm were stored for 48 h in a liquid nitrogen container (-196 °C). They were then airtawed at room temperature (25 °C), and motility, viability and fertilization rates were assessed. The higher motility rates and fertilization rates ($P < 0.05$) were achieved with the combination of 10% DMSO+MC. In addition, motility percentage was not difference with the control (fresh sperm). The highest fertilization rate of $12.88 \pm 1.10\%$ (41% of fresh sperm) was resulting from 10% DMA+HBSS. Among cryoprotectants used, DMSO as cryoprotectant yielded a higher fertilization rates compared to DMA or PG. The highest fertilization rate from each combination of extender and cryoprotectant from the first study (10% DMSO+MC and 10% DMA+HBSS) were used to investigate the effect of freezing rates (one-step and two-steps) with end point at -40, -60 and -80°C on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm (experiment 2). Among treatments used the combination of 10% DMSO+MC yielded a higher motility, viability and fertilization rates than 10% DMA+HBSS. In the third experiment, the effect of sizes and types of the containers by using 10% DMSO+MC with one-step freezing rate at end point -40°C were determined. The results showed that sizes and types of the containers used did not affect fertilization, motility and viability percentages ($P > 0.05$).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
• วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	7
• วัสดุและอุปกรณ์	7
• สารเคมี	8
• การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์	10
• การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ	11
• ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง	14
• Freezing instrumentation	15
• การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	16
• การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	17
• การทดลองที่ 3 ศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	19
บทที่ 4 ผลการศึกษา	21
• ผลของชนิดของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	21
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	24
• ผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไ้โดยวิธีการแช่แข็ง	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	28
• ผลของสาร extenders ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง	28
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง	29
• ผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง	30
• สรุปและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก ตารางแสดงการวิเคราะห์หาเรียนรู้	36
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	41



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาลิตี และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา
ตารางที่ 4	แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง
ตารางที่ 5	แผนการทดลองการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง
ตารางที่ 6	แผนการทดลองการศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง
ตารางที่ 7	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากะโห้ในการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%
ตารางที่ 8	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะโห้ในการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMA) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะโห้ในการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20%
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากะโห้ ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ
ตารางที่ 11	ผลการศึกษา straw size ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)	10
ภาพที่ 2 อสุจิมิซีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้มเมื่อย้อมด้วยสี Eosin - nigrosin (ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า)	12
ภาพที่ 3 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลากระโทง	13
ภาพที่ 4 การพัฒนาของคัพภะปลากระโทงระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)	13
ภาพที่ 5 (ก) สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer counting chamber) (ข) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ	13
ภาพที่ 6 แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง	14
ภาพที่ 7 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4	15



บทที่ 1

บทนำ

ปลากะโห้ Giant barb, *Catlocarpio siamensis* เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ปลาตะเพียนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เกือบมีขนาดใหญ่ ลำตัวมีสีเทาปนดำ ครีบบมีสีแดง อาศัยอยู่ในแม่น้ำภาคกลางของประเทศไทย เช่น แม่น้ำแม่กลอง แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำน้อย แม่น้ำป่าสัก แม่น้ำท่าหลวง และแม่น้ำเจ้าพระยา โดยเฉพาะในบริเวณน้ำลึก หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “วังปลา” ของแม่น้ำเจ้าพระยา ตั้งแต่จังหวัดอยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี ขึ้นไปจนถึงเขื่อนเจ้าพระยา จ.ชัยนาท สามารถจับปลากะโห้ได้มากในเขตจังหวัดสิงห์บุรี เช่น ตำบลบ้านแปง อ.พรหมบุรี ตำบลบ้านไร่ อ.เมือง ตำบลวัดเสือข้าม อ.อินทร์บุรี และบ้านตลุก อ.สรรพยา จ.ชัยนาท (มานพ และคณะ, 2529) เนื่องจากปลากะโห้เป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ และมีอายุการเจริญพันธุ์นาน ดังรายงานของ Sukumasavin (1996) รายงานว่าปลากะโห้ที่มีความสมบูรณ์เพศมีน้ำหนักเฉลี่ย 9 กิโลกรัม และมีอายุ 7 ปี ประกอบกับปลาชนิดนี้เป็นปลาที่เคลื่อนที่ช้า และมักอยู่รวมกันเป็นฝูงในบริเวณน้ำลึก จึงง่ายต่อการถูกจับทำให้ปลากะโห้ในแหล่งน้ำธรรมชาติมักถูกจับได้ก่อนถึงอายุเจริญพันธุ์ ส่งผลกระทบต่อการสืบพันธุ์และวางไข่ จนกลายเป็นปลาหายากและใกล้สูญพันธุ์ ในปัจจุบันจึงไม่มีรายงานการจับปลาชนิดนี้ได้ (Nadesha, 1994) อย่างไรก็ตาม ในปี พ.ศ. 2529 มานพ และคณะ สามารถเพาะขยายพันธุ์ปลากะโห้ ที่เลี้ยงในบริเวณบ่อดินบริเวณสวนจิตรลดา ได้สำเร็จ ด้วยการให้ฮอร์โมนสกัด (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) ในอัตรา 100 IU/Kg ร่วมกับ ต่อมใต้สมองปลา (pituitary gland extract, PG) ในอัตรา 0.8-1.0 โดส ฉีดกระตุ้นให้แก่แม่พันธุ์ปลาในเข็มแรก หลังจากนั้นทิ้งระยะห่าง 8 ชั่วโมง จึงฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง ด้วยฮอร์โมน HCG ในอัตรา 200-500 IU/Kg ร่วมกับฮอร์โมน PG ในอัตรา 1.8-2.0 โดส สำหรับพ่อพันธุ์ปลากะโห้ฉีดด้วยฮอร์โมน PG ในอัตรา 0.5-1.0 โดส พร้อมกับการฉีดฮอร์โมนให้แก่แม่พันธุ์ปลาในเข็มที่สอง อย่างไรก็ตาม ปลากะโห้เป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ การรีดไข่และรีดน้ำเชื้อ มักทำให้พ่อแม่พันธุ์ปลาบอบช้ำและตายเป็นจำนวนมาก แนวคิดในการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลากะโห้ จากแหล่งน้ำธรรมชาติและการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ทดแทน ทำได้ยากและต้องใช้ระยะเวลานาน ส่งผลทำให้การเพาะขยายพันธุ์ปลากะโห้ในระยะหลังขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ปลากะโห้ จึงทำให้ไม่สามารถผลิตลูกปลาได้ตามความต้องการ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้เพื่อเก็บไว้เป็นธนาคารน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดนี้ จึงมีความจำเป็นต้องเร่งดำเนินการอย่างรีบด่วน อันก่อให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐกิจ และอนุรักษ์ปลากะโห้ให้คงอยู่สืบไป

ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเก็บเซลล์สืบพันธุ์ (sperm) สำหรับปลาชนิดนี้ เพื่อประโยชน์สำหรับการเพาะพันธุ์ และอนุรักษ์ปลากะโห้ต่อไป เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว อย่างไรก็ตามเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งยังไม่มีการศึกษาสำหรับปลาชนิดนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง เพื่อหาชนิดของสาร extender สาร cryoprotectant อัตราการลดอุณหภูมิ ขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสม โดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับ cryogenesis version 4 ควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง

1.1 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง

1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant อัตราการลดอุณหภูมิ ขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุ ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง ประโยชน์จากการศึกษาดังกล่าวนี้อาจนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิต ส่งเสริมการเลี้ยงให้กับเกษตรกร ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพราะยังไม่มีการศึกษาและวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลากระโทงมาก่อน และสามารถพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่มเดียวกันที่มีปัญหาล้ำคล้ายคลึงกัน



บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลากะโห้ (*Catlocarpio siamensis*) มีชื่อสามัญว่า Giant carp เป็นปลาน้ำจืดตระกูลคาร์พที่ใหญ่ที่สุดชนิดหนึ่ง มีช่วงฤดูผสมพันธุ์อยู่ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม ปลากะโห้ที่มีความสมบูรณ์เพศมีน้ำหนักเฉลี่ย 9 กิโลกรัม และมีอายุ 7 ปี ประกอบกับปลาชนิดนี้เป็นปลาที่เคลื่อนที่ช้า และมักอยู่รวมกันเป็นฝูงในบริเวณน้ำลึก จึงง่ายต่อการถูกจับทำให้ปลากะโห้ในแหล่งน้ำธรรมชาติมักถูกจับได้ก่อนถึงอายุเจริญพันธุ์ ส่งผลกระทบต่อการสืบพันธุ์และวางไข่ จนกลายเป็นปลาหายากและใกล้สูญพันธุ์ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorrard et al., 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species) ได้เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับไข่ของ Channel catfish, *Ictalurus punctatus* โดย Bart et al. (1998) และ Kainin et al. (2012) ประสบความสำเร็จในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของปลาโหม่ง Mekong catfish, *Pangasius bocourti* ผสมกับไข่ของ *P. hypophthalmus* ซึ่งให้อัตราการปฏิสนธิ $73.88 \pm 1.30\%$ (93% ของน้ำเชื้อสด) นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน ลดพื้นที่การเลี้ยง broodstock สามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต (Piironen, 1993 และ Chereguini et al., 2001) และสามารถแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกันเช่นปลาโหม่ง (*P. bocourti*) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งในปลากะโห้ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว (Long-term storage) นั้นต้องอาศัยสาร extender สาร cryoprotectant และ อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196°C

2.1 ผลของสาร extenders, cryoprotectants และ freezing rates ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม Carp

สาร extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ ก่อนขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง เพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการชะลอการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ โดยสาร extender มีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว นอกจากนี้ปัจจัยต่างๆ อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาว ได้แก่ สาร cryoprotectant และ อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่เหมาะสม สาร cryoprotectant เป็นสารป้องกันการเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการเซลล์ถูกทำลาย (Rana, 1995 และ Akcay et al., 2004) สาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% (Horvath and Urbanyi, 2000; Urbanyi et al., 1999; Chereguini et al., 2001 and Kwantong and Bart, 2003) และพบว่า สาร cryoprotectant ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Wayman and Tiersch, 2000)

อย่างไรก็ตามสารต่างๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในกลุ่มปลา Carp Babiak et al. (1997) ทำการศึกษาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน, *Cyprinus carpio* แบบแช่แข็ง พบว่าเมื่อใช้ BE2 (85 mM NaCl, 50 mM KCl, 3 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 ร่วมกับ 10% egg yolk เป็นสาร extender และใช้ 10% DMA เป็นสาร cryoprotectant ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ $27.5 \pm 2.5 \%$ และ 72.9 ± 0.8 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด อย่างไรก็ตามในปลาชนิดเดียวกันนี้ Lahnsteiner et al. (2000) และ (Linhart et al. 2000) พบว่าการใช้ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ $35.2 \pm 7.1 \%$ และ $78.0 \pm 18.0 \%$ ตามลำดับ นอกจากนี้ Horvath et al. (2003) ทำการศึกษากันเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน พบว่าเมื่อใช้ glucose หรือ fructose เป็นสาร extender ร่วมกับ 10% methanol ให้อัตราการปฏิสนธิ $74 \pm 15\%$ และ $71 \pm 12\%$ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($84 \pm 12\%$)

2.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectant และสาร extender ที่เหมาะสมเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) ในขบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลา เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และเคมีของความร้อน และการแพร่เข้า-ออกของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกของน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เซลล์อาจจะมีการช็อค (cold shock) (Lueng in Jamieson, 1991) เหตุการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า “solution effects” ดังนั้นนอกจากการหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว จึงเกิดแนวคิดที่จะทำการหา endpoint ที่เหมาะสม เพื่อที่เซลล์สุจิจะได้ไม่ถูกผลกระทบจาก solution effects ขณะที่ทำการแช่แข็ง เป็นระยะเวลาที่ยาวนานจนเกินไป ซึ่งจะเป็นการช่วยลดการตายของอสุจิลงได้ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน โดยใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice, อุณหภูมิ -79°C) พบอัตราการรอด สูงที่สุด 91% เมื่อใช้ Kurokura et al. extender + 10% egg yolk และมี 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Babiak et al., 1997) Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($52 \pm 9 \%$ และ $50 \pm 18 \%$ ตามลำดับ) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ two-step freezing rates โดยการลดอุณหภูมิ $4^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก 4°C ถึง -9°C และลดอุณหภูมิที่ $11^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก -9°C ถึง -80°C ต่อมา Akcay et al. (2004) พบว่าอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนเพียง 26% เมื่อใช้การลดอุณหภูมิโดยการอ้อมผ่านไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) นาน 10 นาที ก่อนจุ่มไนโตรเจนเหลว -196°C นอกจากนี้ Linhart et al. (2006) พบว่าอัตราการปฏิสนธิของปลา Paddlefish (*Polyodon spathula*) ไม่มีความแตกต่างระหว่างน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็ง เมื่อใช้การลดอุณหภูมิ 4 step freezing rates ดังนี้ $3^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก 0°C ถึง -5°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก -5°C ถึง -15°C , $10^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก -15°C ถึง -25°C และลดอุณหภูมิที่ $20^\circ\text{C}/\text{min}$ จาก -25°C ถึง -80°C โดยใช้ PLANER Kryo 10 series III เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม Carp ยังมีความหลากหลายและผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้โดยเฉพาะในปลากะโห้ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน

จากการรวบรวมเอกสารการทดสอบการลดอุณหภูมิร่วมกับการหา endpoint ที่แตกต่างกัน พบว่าในปลามีการศึกษาของ Viveiros et al. (2000) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา African catfish (*Clarias gariepinus*) โดยทำการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ (2, 5 และ 10 °C min⁻¹) ร่วมกับการหา endpoint ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (-25 °C ถึง -70 °C) พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min⁻¹ โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -45 หรือ -50 °C และการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min⁻¹ โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -55 °C ส่งผลให้มีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P > 0.05$) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Viveiros et al. (2001) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา *Clarias gariepinus* โดยทำการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ (2, 5 และ 10 °C min⁻¹) ร่วมกับการหา endpoint ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (-35 °C ถึง -65 °C) พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 °C min⁻¹ โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -40 หรือ -45 °C และการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min⁻¹ โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -50 หรือ -55 °C ส่งผลให้มีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P > 0.05$) และในการศึกษาของ Vuthiphandchai et al. (2009) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา Red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) โดยทำการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 4 ระดับ (3, 5, 10 และ 12 °C min⁻¹) ร่วมกับสาร Cryoprotectant ชนิดต่างๆ โดยทำการลดอุณหภูมิไปจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย 2 ระดับ คือ -40 และ -80 °C พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min⁻¹ ร่วมกับการใช้ 10%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant โดยมี endpoint ที่ -40 °C ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด ($68.9 \pm 4.4\%$) แตกต่างจากทริทเมนต์อื่น และในส่วนของกลุ่มที่ใช้ -80 °C เป็นอุณหภูมิสุดท้าย พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min⁻¹ ร่วมกับการใช้ 10%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด ($91.1 \pm 2.2\%$) แตกต่างจากทริทเมนต์อื่นๆ ในส่วนของการทดสอบอัตราการมีชีวิต พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min⁻¹ ร่วมกับการใช้ 10%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant โดยมี endpoint ที่ -40 °C ให้ผลของอัตราการมีชีวิต ($73.2 \pm 5.6\%$) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 12 °C min⁻¹ ร่วมกับการใช้ 5 และ 10%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant และในส่วนของกลุ่มที่ใช้ -80 °C เป็นอุณหภูมิสุดท้าย พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min⁻¹ ร่วมกับการใช้ 10%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant ให้ผลของอัตราการมีชีวิต ($92.7 \pm 2.3\%$) แตกต่างจากทริทเมนต์อื่น

จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ยังมีความหลากหลาย ทั้งอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) ดังนั้นการหาอัตราการลดอุณหภูมิและ endpoint ที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลากระโทงซึ่งยังไม่มีการศึกษา

2.3 ผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาของ Cabrita et al. (2001) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยทดสอบการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งใน straws 3 ขนาด (0.5, 1.8 และ 5 ml.) ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ และพบว่า straw ขนาด 0.5 ml. ให้ผลของอัตราการมีชีวิต (77.4%) และอัตราการปฏิสนธิ (84%) สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการใช้ straw ขนาด 1.8 และ 5 ml และจากการศึกษาของ Rodina et al. (2007)

ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Tench (*Tinca tinca*) แบบแช่แข็ง โดยใช้ straw ขนาด (0.5, 1 และ 5 ml) พบว่าเมื่อใช้ straw ขนาด 5 ml ให้อัตราการฟัก ($33.8 \pm 7.1\%$) ซึ่งไม่แตกต่างจาก straw ขนาด 0.5 ml จากการศึกษาของ Richardson et al. (2000) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Arctic charr เพื่อศึกษาถึงผลของขนาด straw พบว่าอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน เมื่อใช้ straw ขนาด 1.7 ml แบบแบน หรือเมื่อใช้ straw ขนาด 2.5 ml นอกจากนี้การศึกษาของ Yohana et al. (2006) ได้ศึกษาถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา Yamu (*Brycon amazonicus*) โดยทำการทดสอบขนาดของ straws (0.5, 1.8, 2.5 และ 4.0 ml) ร่วมกับอัตราการละลาย (35°C และ 80°C) พบว่าทุกขนาดของ straw ให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเมื่อใช้ straw ขนาด 0.5 ml โดยใช้ร่วมกับอัตราการละลายที่ 80°C จะพบอัตราการเคลื่อนที่ที่ต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการศึกษาของ Lahnsteiner et al. (2003) ทดสอบขนาดของ straw ในปลา Bleak (*Chalcalburnus chalcalburnus*) พบว่าผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งใน straw ขนาด 0.5 ml ให้ผลของอัตราการฟักไม่แตกต่างจากการใช้ straw ขนาด 1.2 ml และการศึกษาของ Lahnsteiner et al. (1997) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากลุ่ม salmonid เพื่อทดสอบถึงขนาด straw โดยพบว่าอัตราการปฏิสนธิที่เกิดจากการใช้ straw ขนาด 0.5 ml ไม่แตกต่างจากการใช้ straw ขนาด 1.2 ml

จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าชนิดและขนาดของภาชนะที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ยังมีความหลากหลาย ทั้งขนาดและชนิดของภาชนะที่บรรจุ และผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาชนิดและขนาดของภาชนะที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลากระโทงซึ่งยังไม่มีการศึกษา โดยปลากระโทงเป็นปลาที่มีความดกไข่สูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ จึงเกิดแนวความคิดในการเก็บรักษาด้วยภาชนะบรรจุที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อลดปริมาณการใช้จำนวน straws ขนาดเล็กที่มากเกินไป ความจำเป็นอีกทั้งยังมีความสะดวก ประหยัดเวลาในการนำไปใช้ผสมกับไข่ในปริมาณมาก

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทง (*Catlocarpio siamensis*) โดยวิธีการเก็บแบบแช่แข็ง มีการดำเนินงานวิจัยศึกษาทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการ ใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดลพบุรี และขอนแก่น และสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลำปาง และภาคสนาม ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดลพบุรี และขอนแก่น และสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลำปาง เป็นสถานที่สำหรับการดำเนินการวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง โดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง โดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต อัตราการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 3 ศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง โดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

โดยใช้วัสดุอุปกรณ์หลัก สารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดฉีดยาและเข็มฉีดยา
2. โกร่งบดฮอว์โมน
3. เปลใส่ปลา
4. ถังพลาสติกขนาด 30 × 80 เซนติเมตร
5. ผ้าขนหนู
6. กะละมัง
7. โหลพลาสติกขนาด 10 ลิตร
8. ท่อลมและปั๊มลม
9. glass petri dish
10. ขนไก่
11. กระตักน้ำแข็ง
12. หลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
13. vortex mixer
14. osmometer
15. rack
16. ตู้เย็น

17. slides และ cover slides
18. ไม้จิ้มฟัน
19. micro pipettes (ขนาด 10, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร)
20. small and large pipettes tips
21. hemacytometer
22. หลอดแช่แข็ง (french straws) ขนาด 0.5, 1.0 และ 1.5 ml.
23. Cryovial ขนาด 1.5 ml.
24. Microtube ขนาด 5 ml.
25. forceps
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์
27. beaker ขนาด 250, 100, 50, 25 มิลลิลิตร
28. graduated cylinders ขนาด 250 มิลลิลิตร
29. glass stirring rod
30. volumetric flasks ขนาด 25, 250 มิลลิลิตร
31. ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร
32. ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
33. Liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor-Wharton U.S.A.)
34. Liquid nitrogen storage with dispenser
35. cryobath
36. cryochamber
37. cryocane
38. cryo gloves
39. freezer control (CL 3300)
40. compound microscope and Stereo microscope
41. computer and software operating manual (cryogenesis version 4 for windows)
42. pH meter
43. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM; model JEOL, JSM 6400)
44. เทปสองหน้าขนาดบางสำหรับติดตัวอย่างบนสตั๊ป (stub)
45. สตั๊ป (stub)
46. เครื่องทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (Critical Point Dryer, CPD) รุ่น Samdri- PvT-3B
47. เครื่องฉาบทอง (Ion sputter) รุ่น JFC-1100 E
48. ฟิล์มถ่ายรูปขาวดำ VP 120 ใช้กับ SEM

3.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น
2. ไนโตรเจนเหลว

3. Sodium chloride (NaCl)
4. Potassium chloride (KCl)
5. Calcium chloride dehydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
6. Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)
7. Magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
8. Disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
9. Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)
10. Tris-Hydroxymethyl-Methylamine ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)
11. Glucose
12. Fructose
13. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
14. Methanol (MeOH)
15. Dimethyl acetamide (DMA)
16. Propylene glycol (PG)
17. Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)
18. Domperidone (Motilium M)
19. Human chorionic Gonadotropin (HCG)
20. Eosin Y disodium salt
21. Nigrosin water soluble
22. Colchicin
23. Potassium choride
24. Absolute ethyl alcohol
25. Glacial acetic acid
26. Giemsa's stain
27. Glutaraldehyde
28. Osmium tetraoxide
29. Ethanol
30. Phosphate buffer solution
31. ทองสำหรับฉาบผิวตัวอย่าง
32. Gilson solution
33. น้ำยาแช่เลนส์
34. น้ำยาเคลือบเล็บ
35. Oil

3.3 วิธีการศึกษา

1) การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม ก่อนทำการทดลองต้องคัดพ่อแม่พันธุ์ปลากระโทงที่สมบูรณ์เพศและแข็งแรง จากบ่อดินมาพักไว้ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 2 ลูกบาศก์เมตร โดยแยกเพศผู้และเพศเมียเพื่อทำการฉีดฮอร์โมน โดยมีวิธีการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ปลากระโทงดังต่อไปนี้คือ

- **ปลากระโทงเพศผู้** มีลำตัวขนาดเล็กและเรียกว่าปลาเพศเมีย ส่วนท้องแบนเรียบ สีดำคล้ำกว่าตัวเมียและบริเวณรอบ ๆ ช่องเพศมีตุ่มขรุขระยื่นออกมา เมื่อบีบท้องเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อไหลออกมาทางช่องเปิด ซึ่งมีรูปร่างกลมและเล็ก นำพ่อแม่พันธุ์ปลากระโทงที่แข็งแรงสมบูรณ์เพศมาทำการฉีดฮอร์โมนโดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium M) โดยใช้ Suprefact 10 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมง ทำการรีดน้ำเชื้อ (ภาพที่ 1 ก) ก่อนทำการรีดน้ำเชื้อควรใช้ผ้าขนหนูสะอาดเช็ดตัวปลาให้แห้ง และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณตึงเพศ (Urogenital pore) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และมีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป

- **ปลากระโทงเพศเมีย** มีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ ลำตัวสั้น บ่อม ปลาเพศเมียที่ไข่แก่ ส่วนท้องจะอูมเป่งและนูน ช่องเปิดมีลักษณะเป็นรูปไข่ กลมมน และมีสีชมพูหรือแดง นอกจากการสังเกตจากภายนอกแล้วยังมีวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ หรือวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ flexible catheter ดูดไข่ออกมาใส่ในขวดที่มีน้ำยา gillson จากนั้นนำมาวัดขนาดไข่ ถ้าพบว่าไข่มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของไข่ประมาณ 1.4 มิลลิเมตร จึงนำมาฉีดด้วย Suprefact โดยฉีด 2 เข็มๆ ละ 20 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม โดยฉีดเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 6 ชั่วโมง หลังจากฉีดเข็มที่ 2 แล้ว 4 ชั่วโมงทำการรีดไข่ (ภาพที่ 1 ข) ก่อนการรีดไข่ควรใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลาและใช้กระดาษทิชชู ซับบริเวณตึงเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้งและสะอาดรองรับไข่ (ภาชนะพลาสติก) เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิ โดยไข่ที่นำมาใช้ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิจะต้องไม่มีการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ไข่ปลากระโทงควรมีขนาดที่สม่ำเสมอ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร สีน้ำตาลเข้ม และไข่ไม่เกาะกันเป็นก้อน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 1 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)

2) การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น น้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งเจือปน โดยมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อจากลักษณะต่างๆ ดังนี้

2.1) การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อดูอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง compound microscope (10X) โดยเกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	การเคลื่อนที่ (%)
อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่	100
อสุจิส่วนใหญ่เคลื่อนที่ (3/4)	75
อสุจิบางตัวเคลื่อนที่ (2/4)	50
อสุจิส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ มีเพียงเล็กน้อยที่เคลื่อนที่ (1/4)	25
อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่	0

ดัดแปลงจาก: Guest (1973)

2.2) การศึกษาอัตราการมีชีวิต

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ทำได้โดยวิธีการย้อมสี Eosin-nigrosin (ส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2 และวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin

ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
eosin B	1 กรัม
nigrosin	5 กรัม
sodium citrate dihydrate	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ที่มา: Hambananda (1996)

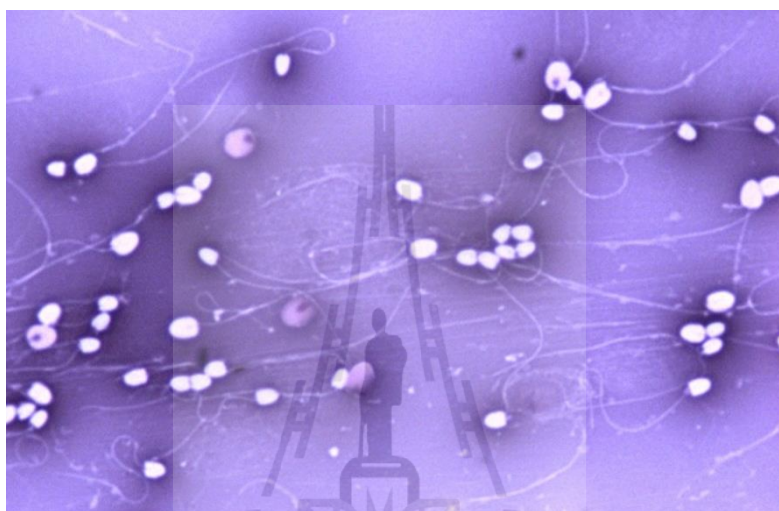
วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

ชั่ง eosin B 1 กรัม nigrosin 5 กรัม และ sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ใน beaker และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้องให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เมื่อสารละลายเข้ากันดีนำไปกรองจนไม่มีตะกอน จากนั้นนำสีย้อมไปเก็บในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี eosin-nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อลงข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร

- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว
- นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วปิดด้วย cover slips จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า
- นับจำนวนอสุจิตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่อสุจิตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 2

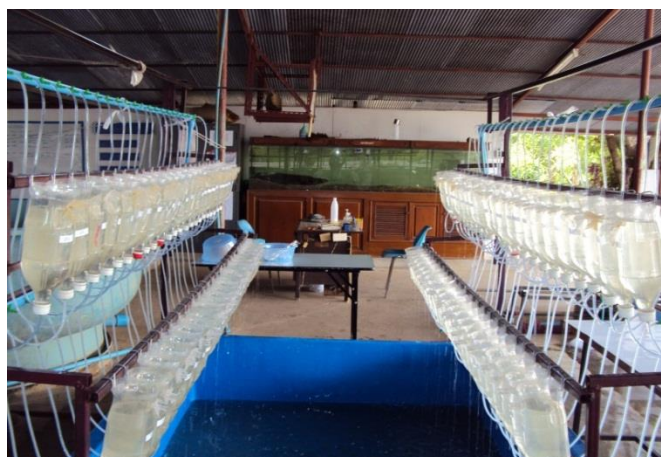


ภาพที่ 2 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม
กำลังขยาย 100 เท่า

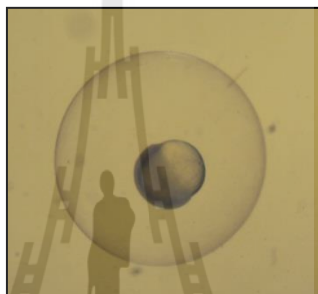
2.3) การศึกษาอัตราการปฏิสนธิ

การศึกษาการปฏิสนธิเป็นการทดสอบความสามารถของอสุจิในการผสมกับไข่ โดยการนำแม่ปลากระโทงแทงให้ไข่ หลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 แล้ว 8 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะไข่ปลาที่ดีจะมีสีเหลืองอำพัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 200 ไมโครลิตร (มีไข่จำนวน 129 ± 6.69 ฟอง) ใส่จานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตรดูดน้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง ลงไปผสมกับไข่ ใช้ชนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำเพาะฟักลงไป 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีแล้วใช้ชนไก่เขี่ยไข่จากจานแก้วใส่ลงในขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร ที่มีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลาขณะทำการเพาะฟัก ดังแสดงในภาพที่ 3 หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการตรวจนับการปฏิสนธิที่ระยะ gastrula stage (ภาพที่ 4) และคำนวณหาอัตราการปฏิสนธิตามสมการดังนี้

$$\text{การปฏิสนธิ (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะ gastrula stage} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$



ภาพที่ 3 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลากะโห้

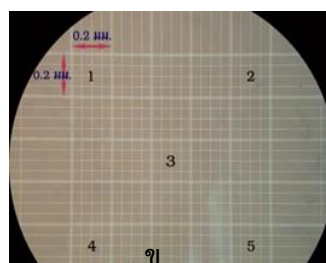
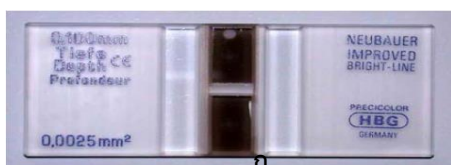


ภาพที่ 4 การพัฒนาของคัพภะปลากะโห้ระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)

2.4) การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสาร extender ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสาร extender เท่ากับ 1: 1500 ขณะที่ทำการดูน้ำเชื้อควรใช้กระดาษทึบๆ ชุบน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipettes tips จากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber) (ดังภาพที่ 5 ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง (ดังภาพที่ 5 ข) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

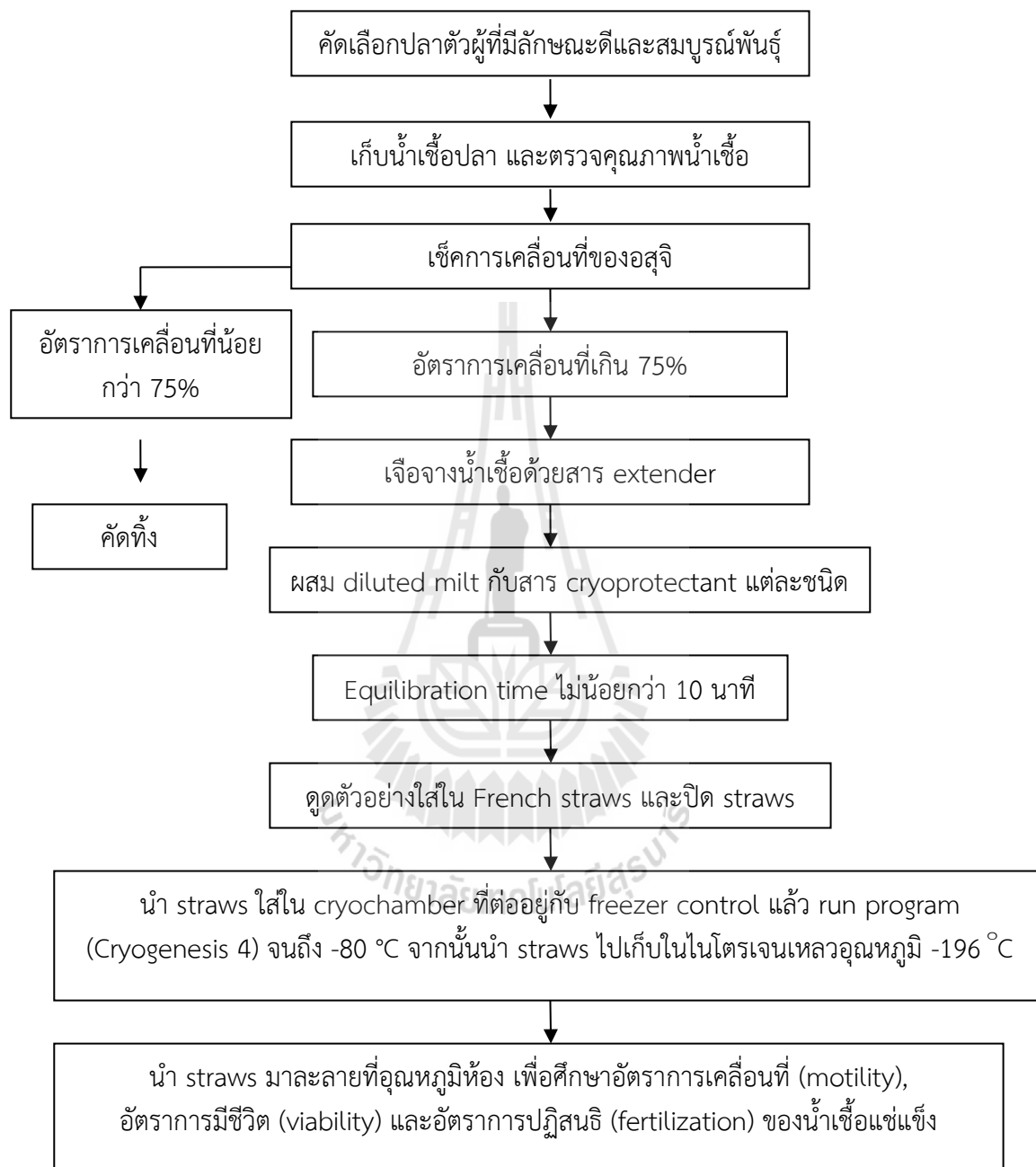
$$\text{จำนวนอสุจิ / มิลลิลิตร} = (\text{รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ} / 5) \times 25 \times \text{dilution rate} \times 10^4$$



ภาพที่ 5 (ก) สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber), (ข) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5)

3.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

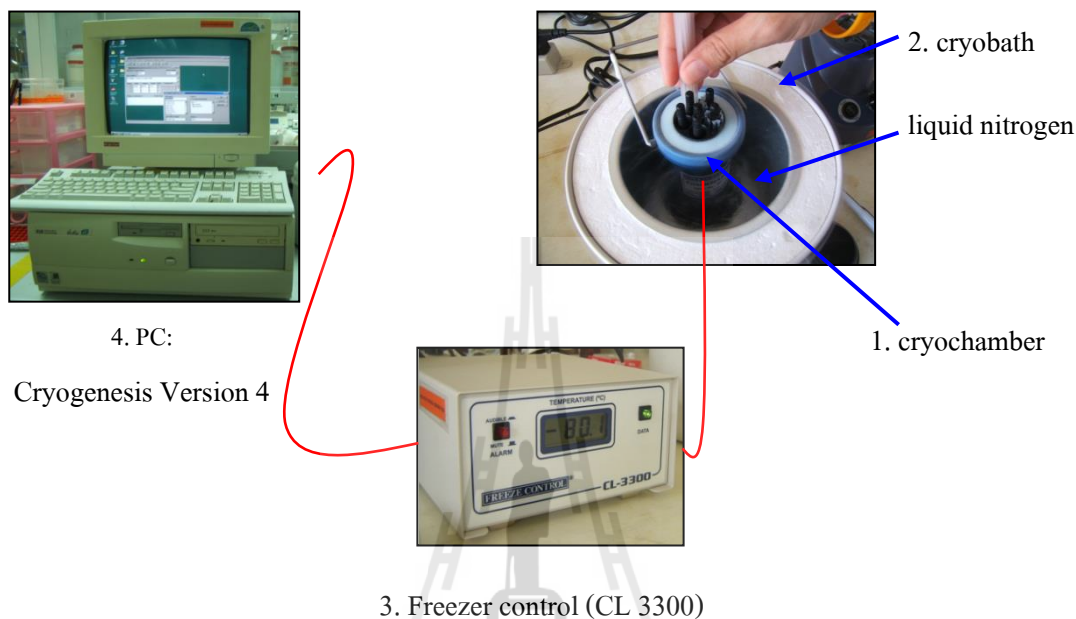
นำน้ำเชื้อสดของปลากระโทงที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยมีขั้นตอนดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง

3.5 Freezing instrumentation

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทะเลให้โดยวิธีการแช่แข็งใช้ Freezer control (CL 3300), cryobath, cryochamber และ Cryogenesis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia 1998 and 1999) เป็นตัวช่วยในการควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4

โดยมีขั้นตอนการ Run program และใช้คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ ดังนี้

โดยเติมไนโตรเจนเหลว (LN_2) ลงใน cryobath ให้สูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamber ลงไปแล้วปิดฝาโดยที่ cryochamber จะต่ออยู่กับ freezer control (CL 3300) และ freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิตามที่ต้องการ โดยใช้เมนู execute จากโปรแกรม Cryogenesis 4 นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ดูดใส่ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา แล้วทำการ run program จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์ และ freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ freezer control ถึงอุณหภูมิสุดท้าย (end point) ตามที่ต้องการจึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เพื่อนำไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาไข่เชื้อปลากกระโทงโดยวิธีการแช่แข็ง

ทำการศึกษาสาร extenders 2 ชนิด ได้แก่ Hanks' balanced salt solution (HBSS) และ Modified Cortland solution (MC) ร่วมกับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant 3 ระดับ (5, 7.5 และ 10%) สำหรับการใช้ DMSO และ DMA เป็นสาร cryoprotectants แต่สำหรับการใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant ใช้ความเข้มข้น 10, 15 และ 20% ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) เตรียมสาร extender 2 สูตร คือ HBSS และ MC โดยมีส่วนประกอบของแต่ละสูตรน้ำยา ดังแสดงในตารางที่ 3 วัดค่า pH ของ extender และวัดค่า osmolality นำ extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 °C

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาลิตี และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมี (mM)	สาร extender MC	HBSS
NaCl	112.07	137.93
KCl	40.54	5.41
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.06	1.10
NaHCO ₃	2.38	4.17
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-	0.81
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	-	0.45
KH ₂ PO ₄	-	0.44
Glucose	-	5.56
pH	8.00±0.04	8.00±0.02
Osmolality	285.33±0.6	280.33±0.6

หมายเหตุ: MC; Modified Cortland solution และ HBSS; Hanks' balanced salt solution

2) เตรียมสาร cryoprotectant ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ DMSO และ DMA ใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 5, 7.5 และ 10% สำหรับ PG ใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 10, 15 และ 20% นำสาร cryoprotectant ที่เตรียมแล้วใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 °C

3) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1: 3 ผสมให้เข้ากัน (diluted milt) หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant ได้แก่ DMSO, DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10% และ PG ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% โดยใช้สัดส่วน 1: 3 ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 4

4) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 3 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcept ลนไฟจนร้อน แล้วหนีปากหลอดแช่แข็ง ซึ่งหลังจากที่เติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน cryochamber ใช้เวลาประมาณ 10 นาที

ตารางที่ 4 แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

Treatment	สาร Extender	Cryoprotectants (%)
1	HBSS	5, 10*
2	HBSS	7.5, 15*
3	HBSS	10, 20*
4	MC	5, 10*
5	MC	7.5, 15*
6	MC	10, 20*
7 (Control, น้ำเชื้อสด)		

หมายเหตุ: สาร cryoprotectant ที่ใช้มี 3 ชนิดคือ DMSO, DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10% และ PG* ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20%

5) นำ straw ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา เลือกอุณหภูมิที่ต้องการ (One-step procedure $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) จากนั้น Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80°C แล้วนำ frozen straws ไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัด treatment แบบ 2×3 factorial คือใช้สาร extender 2 ชนิด ได้แก่ MC และ HBSS ร่วมกับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant 3 ระดับ (5, 7.5 และ 10%) สำหรับ DMSO และ DMA แต่สำหรับการใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant ใช้ความเข้มข้น 10, 15 และ 20% โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ ทำการทดลอง 6 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 โดยเลือกสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิดที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และ

10% DMA ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ ได้แก่ -40 , -60 และ -80°C) ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender (MC และ HBSS) ที่อัตราส่วน sperm: extender 1: 3 (diluted milt) จากนั้นนำมาผสมกับ 10% DMSO หรือ 10% DMA โดยใช้สัดส่วน 1: 3

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (french straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcept ลนไฟจนร้อนแล้วหนีปากหลอดแช่แข็ง

3) นำ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝาเลือกอัตราการลดอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาทั้ง 2 แบบ ได้แก่ One-step และ Two-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ (-40 , -60 และ -80°C) ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 5 จากนั้น run program จนอุณหภูมิที่ freezer control ถึงอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) ที่ต้องการจึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีการแช่แข็ง

Treatment	Cryoprotectant + Extender	Freezing rate	Endpoint (°C)
1	10% DMSO + MC	One-step	-40
2			-60
3			-80
4		Two-steps	-40
5			-60
6			-80
7	10% DMA + HBSS	One-step	-40
8			-60
9			-80
10		Two-steps	-40
11			-60
12			-80
13	กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัด treatment แบบ $2 \times 2 \times 3$ factorial คือ เลือกสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step และ Two-steps ร่วมกับการเปรียบเทียบอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ (-40°C , -60°C และ -80°C) โดยใช้ น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม โดยมีจำนวน 6 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ สำหรับการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ส่วนอัตราการปฏิสนธิได้ทำการทดสอบ 4 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

การทดลองที่ 3 ศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 2 โดยการนำ Treatment ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -40°C มาทำการศึกษขนาดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษขนาดของภาชนะบรรจุ 5 ขนาด ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิลิตร ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

- 1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender (MC) ที่อัตราส่วน sperm: extender 1: 3 (diluted milt) จากนั้นนำมาผสมกับ 10% DMSO โดยใช้สัดส่วน 1: 3
- 2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ใส่ภาชนะขนาดบรรจุทั้ง 5 ขนาด ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางแผนการทดลองตารางที่ 6
- 3) นำภาชนะบรรจุจากข้อ 2 ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา เลือกอัตราการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -40°C จากนั้น run program จนอุณหภูมิที่ freezer control ถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40°C จึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของสุจิต่อไป

ตารางที่ 6 แผนการทดลองการศึกษาขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไช้โดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ 10% DMSO+MC และอัตราการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -40°C

Treatment	Straw size (ml)
1	0.25
2	0.5
3	1
4	2
5	5
6 Control (น้ำเชื้อสด)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาขนาดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงไช้โดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาขนาดของภาชนะบรรจุ 5 ขนาด ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิลิตร โดยมีน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต 6 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ส่วนอัตราการปฏิสนธิได้ทำการทดสอบ 5 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลของสาร extenders ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทะเลโดยใช้วิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาสาร extenders 2 ชนิด (HBSS และ MC) ร่วมกับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant 3 ระดับ (5, 7.5 และ 10%) สำหรับ DMSO และ DMA แต่สำหรับการใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant ใช้ความเข้มข้น 10, 15 และ 20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ และเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปประเมินคุณภาพจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

จากการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 10 %DMSO ร่วมกับ MC จะให้อัตราการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ $93.30 \pm 6.71\%$ (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P > 0.05$) และให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ $16.39 \pm 1.33\%$ (52% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาแต่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; ตารางที่ 7) เมื่อทดสอบอัตราการมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้ 7.5% DMSO ร่วมกับ MC จะมีอัตราการมีชีวิตสูงเท่ากับ $92.52 \pm 1.63\%$ (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับการใช้ 5 และ 10% DMSO ร่วมกับ HBSS และการใช้ 5% DMSO ร่วมกับ MC อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)



ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาคาร์พ ในสาร extender 2 ชนิด (MC และ HBSS) ร่วมกับการใช้สาร cryoprotectant (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min⁻¹

Extender	Concentration	Motility (%)	Viability (%)	Fertilization (%)
HBSS	5%	21.32±6.02 ^d	85.67±2.14 ^{bc}	2.95±1.03 ^e
		(21.32)	(85.86)	(9.35)
	7.5%	54.36±4.61 ^{bc}	77.33±4.78 ^c	6.13±0.96 ^{cd}
		(54.36)	(77.50)	(19.42)
	10%	71.13±7.16 ^b	79.66±4.27 ^{bc}	8.81±0.75 ^c
		(71.13)	(79.84)	(27.89)
MC	5%	37.06±3.35 ^{cd}	83.30±2.80 ^{bc}	5.62±1.21 ^d
		(37.06)	(83.49)	(17.78)
	7.5%	62.94±8.44 ^{bc}	92.52±1.63 ^b	5.89±0.87 ^{cd}
		(62.94)	(92.73)	(18.63)
	10%	93.30±6.71 ^a	88.60±4.96 ^{bc}	16.39±1.33 ^b
		(93.30)	(88.80)	(51.88)
Control		100.00±0.00 ^a	99.78±1.71 ^a	31.59±0.91 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

จากการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 7.5 และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS จะให้อัตราการเคลื่อนที่สูงเท่ากับ 45.64±4.61% และ 45.64±6.02 % ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา (P>0.05) แต่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อใช้ 5% DMA ร่วมกับ HBSS จะให้อัตราการมีชีวิตสูงเท่ากับ 92.63±0.98% (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา (P>0.05) แต่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05; ตารางที่ 8) สำหรับการทดสอบอัตราการมีชีวิตพบว่า เมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ HBSS จะให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 12.88 ±1.10 % (41% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษาแต่มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05; ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาทะเลในสาร extender 2 ชนิด (MC และ HBSS) ร่วมกับการใช้สาร cryoprotectant (DMA) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min⁻¹

Extender	Concentration	Motility (%)	Viability (%)	Fertilization (%)
HBSS	5%	37.06±3.35 ^b	92.63±0.98 ^b	4.07±0.62 ^d
		(37.06)	(92.83)	(12.88)
	7.5%	45.64 ±4.61 ^b	84.34±5.85 ^b	5.44±0.88 ^{cd}
		(45.64)	(84.34)	(17.21)
	10%	45.64±6.02 ^b	78.97±5.21 ^b	12.88±1.10 ^b
		(45.64)	(79.15)	(40.77)
MC	5%	17.86±5.00 ^b	83.30±4.43 ^b	4.91±1.13 ^{cd}
		(17.86)	(83.48)	(15.53)
	7.5%	32.90±8.37 ^b	88.67±4.19 ^b	3.79±0.66 ^d
		(32.90)	(88.87)	(11.98)
	10%	32.90±3.16 ^b	86.42±4.43 ^b	8.29±1.64 ^c
		(32.90)	(86.62)	(26.25)
Control		100.00±0.00 ^a	99.78±1.71 ^a	31.59±0.91 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

จากการใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 15% PG ร่วมกับ MC จะให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดเท่ากับ 95.32±8.14 % (95% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด และไม่แตกต่างกับการใช้ 20% PG ร่วมกับ HBSS และการใช้ 20% PG ร่วมกับ MC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05; ตารางที่ 9) และเมื่อใช้ 15% PG ร่วมกับ HBSS จะให้อัตราการมีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 85.85±6.62% (86% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำเชื้อสด (P<0.05) เมื่อทดสอบอัตราการปฏิสนธิพบว่าพบว่าการใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำในทุกทรีทเมนต์

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากะโห้ ในสาร extender 2 ชนิด (MC และ HBSS) ร่วมกับการใช้สาร cryoprotectant (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

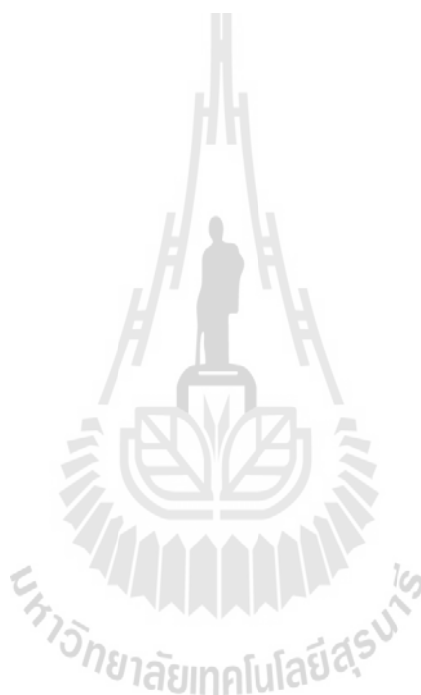
Extender	Concentration	Motility (%)	Viability (%)	Fertilization (%)
HBSS	10%	32.90±3.16 ^b	84.11±5.35 ^b	0.55±0.34 ^{bc}
		(32.90)	(84.30)	(7.55)
	15%	45.64±2.50 ^b	85.85±6.62 ^b	1.78±1.14 ^b
		(45.64)	(86.04)	(24.52)
	20%	90.96±8.14 ^a	83.69±3.97 ^b	0.00±0.00 ^c
		(90.96)	(83.88)	(0.00)
MC	10%	37.06±3.35 ^b	76.24±2.73 ^b	0.41±0.27 ^{bc}
		(37.06)	(76.41)	(5.65)
	15%	95.32±8.14 ^a	77.30±3.08 ^b	1.64±0.46 ^b
		(95.32)	(77.48)	(22.62)
	20%	93.30±10.25 ^a	71.52±2.36 ^b	0.68±0.00 ^{bc}
		(93.30)	(71.68)	(9.37)
Control		100.00±0.00 ^a	99.78±1.712 ^a	31.59±0.91 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

4.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

การศึกษ้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้ เป็นการเลือกสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิดที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษ้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษ้อัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ ได้แก่ -40°C , -60°C และ -80°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปประเมินคุณภาพจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ 10% DMSO + MC ที่มีการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -40°C จะให้อัตราการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ $100.00\pm 0.00\%$ (100% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และการใช้ 10% DMSO + MC ที่มีการลดอุณหภูมิแบบ One-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -60°C อย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และเมื่อใช้ 10% DMSO + MC ที่มีการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps

ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -80°C จะให้อัตราการมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ $88.50 \pm 1.09\%$ (100.00% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดและการใช้ 10% DMSO + MC ที่มีการลดอุณหภูมิแบบ One-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -40°C และการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -40°C อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) สำหรับการทดสอบอัตราการปฏิสนธิพบว่า เมื่อใช้ 10% DMSO + MC มีการลดอุณหภูมิแบบ One-steps ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย -40°C จะให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงเท่ากับ $15.54 \pm 1.99\%$ (55% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งแตกต่างกับวิธีหมั่นอื่นที่ใช้ในการศึกษาและต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; ตารางที่ 10)



ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากะโท ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps

Cryoprotectant + Extender	Freezing rate	Endpoint (°C)	Motility (%)	Viability (%)	Fertilization (%)	
10% DMSO + MC	One-step	-40	83.33±8.33 ^b (83.33)	85.50±1.59 ^a (96.61)	15.54±1.99 ^b (54.77)	
		-60	91.67±5.27 ^{ab} (91.67)	86.00±2.52 ^a (97.18)	9.12±0.89 ^c (32.15)	
		-80	70.83±4.17 ^{cd} (70.83)	79.00±1.83 ^b (89.27)	8.11±0.83 ^c (28.57)	
	Two-steps	-40	100.00±0.00 ^a (100.00)	85.33±1.96 ^a (96.42)	1.35±0.62 ^d (4.77)	
		-60	62.50±5.59 ^{de} (62.50)	78.83±1.89 ^b (89.08)	6.76±1.61 ^c (23.80)	
		-80	87.50±8.54 ^{ab} (87.50)	88.50±1.09 ^a (100.00)	6.76±2.05 ^c (23.81)	
	10% DMA + HBSS	One-step	-40	58.33±8.33 ^{def} (58.33)	65.17±5.50 ^c (73.63)	1.86±0.17 ^d (6.55)
			-60	45.83±7.68 ^{def} (45.83)	57.83±4.02 ^{cd} (65.35)	1.69±0.44 ^d (5.96)
			-80	79.17±7.68 ^{bc} (79.17)	79.67±1.43 ^b (90.02)	8.62±0.58 ^c (30.36)
Two-steps		-40	33.33±5.27 ^f (33.33)	54.67±2.28 ^d (61.77)	0.68±0.39 ^d (2.38)	
		-60	41.67±5.27 ^{ef} (41.67)	53.17±3.55 ^d (60.08)	0.85±0.64 ^d (2.98)	
		-80	37.50±5.59 ^{ef} (37.50)	40.83±4.04 ^e (46.14)	1.02±0.58 ^d (3.58)	
กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)			100.00±0.00 ^a	88.50±0.89 ^a	28.38±1.89 ^a	

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

4.3 ผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโทโดยวิธีการแช่แข็ง

การศึกษาลผลของ straw size ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโทโดยวิธีแช่แข็ง จะดำเนินการโดยให้นำ Treatment ที่ให้อัตราการปฏิสนธิดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 คือ 10% DMSO ร่วมกับ MC และใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -40°C มาทำการศึกษขนาดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโทโดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษขนาดของภาชนะบรรจุ 5 ขนาด ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปประเมินคุณภาพจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่าการใช้ straw size ขนาด 1 ml และใช้ cryovial ขนาด 2 และ 5 ml ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ $91.67 \pm 5.27\%$ (92% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดและทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และการใช้ cryovial ขนาด 5 ml จะให้อัตราการมีชีวิตเท่ากับ $87.50 \pm 1.23\%$ (100% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดและการใช้ straw size ขนาด 0.25, 0.5 และ 1 ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับการทดสอบอัตราการปฏิสนธิพบว่า เมื่อใช้ straw size ขนาด 0.25 ml จะให้อัตราการปฏิสนธิสูงเท่ากับ $16.62 \pm 1.21\%$ (58% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆที่ใช้ในการศึกษา ($P > 0.05$) แต่มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$; ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย (mean \pm S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากะโทเมื่อใช้ขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่ต่างๆ เมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ MC และใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -40°C

Cryoprotectant+Extender	Container (ml)	Motility (%)	Viability (%)	Fertilization (%)
10% DMSO+MC	0.25	87.50 ± 5.59 (87.50)	84.33 ± 0.61^{ab} (96.56)	16.62 ± 1.21^b (58.13)
	0.5	87.50 ± 5.59 (87.50)	84.17 ± 2.32^{ab} (96.37)	12.39 ± 1.87^b (43.35)
	1	91.67 ± 5.27 (91.67)	83.17 ± 1.54^{ab} (95.23)	11.55 ± 1.29^b (40.39)
	2	91.67 ± 5.27 (91.67)	81.00 ± 1.18^b (92.75)	15.07 ± 1.86^b (52.71)
	5	91.67 ± 5.27 (91.67)	87.50 ± 1.23^a (100.19)	12.53 ± 1.60^b (43.83)
Control (น้ำเชื้อสด)		100.00 ± 0.00	87.33 ± 1.12^a	28.59 ± 2.49^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 ผลของสาร extenders ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตงโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตงโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ MC ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ และสูงกว่าการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 7.5% ($P < 0.05$) อีกทั้งยังให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($P > 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก 10% DMSO สามารถช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และยังช่วยคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และ osmotic stress ได้ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Lahnsteiner et al. (2000) ได้ทำการศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาใน, *Cyprinus carpio* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ Buffered Sperm Motility Inhibiting Saline (BSMIS) ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ (35.2 ± 3.2) สูงกว่าการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 15% (18.7 ± 3.2 และ 23.4 ± 4.1 ตามลำดับ; $P < 0.05$) และยังให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ Methanol และ Ethylene glycol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ($P < 0.05$) ผลการศึกษาที่ได้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Alvarez et al. (2003) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Hypophthalmichthys molitrix* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ NaCl 68.38 mmol/L, sodium citrate 27.20 mmol/L และ dextrose 11.01 mmol/L ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ (75%) สูงกว่าการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 7% และให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ glycerol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7 และ 10% อีกทั้งยังให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) และผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Basavaraja and Hegde (2004) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Tor khudree* ก็พบว่าการใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ Methanol และ Propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นสาร cryoprotectant นอกจากนี้ Linhart et al. (2000) ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาใน, *Cyprinus carpio* แบบแช่แข็ง โดยใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ Kurokura-1 พบว่าให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ $69 \pm 14.0\%$ และ $56 \pm 10.0\%$ ตามลำดับ การใช้ DMA ร่วมกับสาร extender (HBSS และ MC) ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ($P < 0.05$) แต่ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำอยู่ในช่วง 18-46% ซึ่งต่ำกว่า DMSO ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 21-93% ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Wernecke and Pluta (2003) พบว่าเมื่อใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิสนธิและการฟักในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาใน (Common carp, *Cyprinus carpio*) เช่นเดียวกันในการศึกษาของ Baulny et al. (1999) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา European catfish พบว่าการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant จะช่วยรักษาลังงาน หรือช่วยกระตุ้นในกระบวนการ ATP ให้กับเซลล์เพื่อให้เซลล์มี

สภาพคงอยู่หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มปลา Salmonid (Babiak et al., 2001; Richardson et al., 2000) และเมื่อใช้ PG เป็นสาร cryoprotectant พบว่าระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น 15 และ 20% ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 10% แต่ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ อีกทั้งการใช้ PG ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ DMSO และ DMA เป็นสาร cryoprotectant ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สาร PG ในระดับความเข้มข้นที่สูง มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิและก่อให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของเซลล์อสุจิ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Basavaraja and Hegde (2004) ได้ทำการศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Tor khudree* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 10% PG เป็นสาร cryoprotectant ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ (5.0 ± 0.0) ต่ำกว่าการใช้ DMSO ในระดับความเข้มข้นเดียวกัน (48.33 ± 1.67) ($P < 0.05$) และผลการศึกษาที่ได้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al. (2005) ได้ทำการศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Paralichthys olivaceus* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ PG ในระดับความเข้มข้นที่สูง (20, 25 และ 30%) เป็นสาร cryoprotectant มีผลทำให้อัตราการมีชีวิตลดลง ($P < 0.05$) การศึกษาในครั้งนี้พบอัตราการปฏิสนธิต่ำในการทุกการทดลองทั้งส่วนของกลุ่มควบคุมและทรีตเมนต์ทั้งนี้เนื่องมาจากไข่ของแม่ปลาไม่มีความสมบูรณ์พันธุ์

5.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตงโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตง โดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ 11 min^{-1} จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 , -60 และ -80°C พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ one-step และ two-steps ณ จุด end point (อุณหภูมิสุดท้าย) ที่ -40 , -60 และ -80°C โดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ MC ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตรอด และอัตราการปฏิสนธิ สูงกว่าการใช้ 10% DMA ร่วมกับ HBSS ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ one-step และ two-steps ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้สาร DMSO เป็นสาร cryoprotectant สามารถช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และยังช่วยคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และ osmotic stress ได้ดีกว่าการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Vuthiphandchai et al. (2009) ได้ศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* แบบแช่แข็ง พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 25°C ถึง -80°C ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $12^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Gwo et al. (1991; Suquet et al. 2000; เกรียงศักดิ์, 2545 และ Kwantong and Bart, 2003) นอกจากนี้ Viveiros et al. (2000) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* โดยทำการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ (2, 5 และ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) ร่วมกับการหา endpoint ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน (-25°C ถึง -70°C) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5°C

min^{-1} โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -45 หรือ -50 $^{\circ}\text{C}$ และการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ โดยทำการลดอุณหภูมิจนถึง -55 $^{\circ}\text{C}$ ส่งผลให้มีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำแข็งสด ($P > 0.05$) สำหรับประเด็นของจุด endpoint ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน เนื่องจากผลที่ได้ยังมีความแปรปรวน อาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาข้อสรุป

5.3 ผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตงโดยวิธีการแช่แข็ง

การใช้ Straw ขนาดเล็ก 0.25 ml และ 0.5 ml ได้รับความนิยมแพร่หลายและประสบความสำเร็จในการใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหลายชนิด (Velasco-Santamaria et al., 2006) ส่วนใหญ่ใช้เพื่อจุดประสงค์สำหรับการเก็บเป็น gene bank หรือเพื่อการใช้ประโยชน์ในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์เชิงธุรกิจสำหรับการเพาะเลี้ยงนั้น จำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อผสมกับไขในปริมาณมาก การประยุกต์ใช้ขนาด straw หรือภาชนะบรรจุที่ใหญ่ขึ้นขนาด (1.8 , 2 หรือ 5 ml) น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับปลาที่มีความดกไขมากอย่างกระโทงเตง ทั้งนี้เพื่อประหยัดเวลา ลดการใช้จำนวน straw ขนาดเล็กที่มากเกินไปอีกทั้งยังมีความสะดวกในการผสมเทียมอีกด้วย จากการศึกษาผลของขนาดและชนิดของภาชนะบรรจุที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงเตง โดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าการใช้ Straw ขนาด 0.25 , 0.5 และ 1 ml และการใช้ cryovial ขนาด 2 และ 5 ml ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Cabrita et al. (2001) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Tench, *Tinca tinca* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ straw size ขนาด 0.5 , 1.8 และ 5 ml ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Rodina et al. (2007) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Tench, *Tinca tinca* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ straw ขนาดต่างๆ (0.5 , 1 และ 5 ml) และการใช้ cryovial ขนาด 1 ml ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ($P > 0.05$) และสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Yohana et al. (2006) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Brycon amazonicus* แบบแช่แข็งพบว่าหลังจากการละลายที่อุณหภูมิ 35 $^{\circ}\text{C}$ การใช้ straw ขนาด 0.5 , 1.8 , 2.5 และ 4.0 ml ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ Velasco-Santamaria et al. (2006) พบว่าการใช้ straw ขนาด 0.5 , 1.8 , 2.5 และ 4.0 ml ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันในปลา yamu, *Brycon amazonicus* สอดคล้องกับการศึกษาของ Lahnsteiner et al. (1997) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Salmonid พบว่าการใช้ straw ขนาด 0.5 และ 1.2 ml ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Ninhaus-Silveira et al. (2006) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Matrinxa, *Brycon cephalus* พบว่าการใช้ straw ขนาด 0.5 และ 4.0 ml ไม่มีผลต่ออัตราการฟัก ดังนั้นหากต้องการเก็บน้ำเชื้อปลากระโทงเตงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เชิงธุรกิจสำหรับการเพาะเลี้ยงเห็นควรเลือกใช้ภาชนะบรรจุที่มีขนาดใหญ่เช่น Straw ขนาด 1 ml หรือใช้ cryovial ขนาด 2 และ 5 ml

สรุปและข้อเสนอแนะ

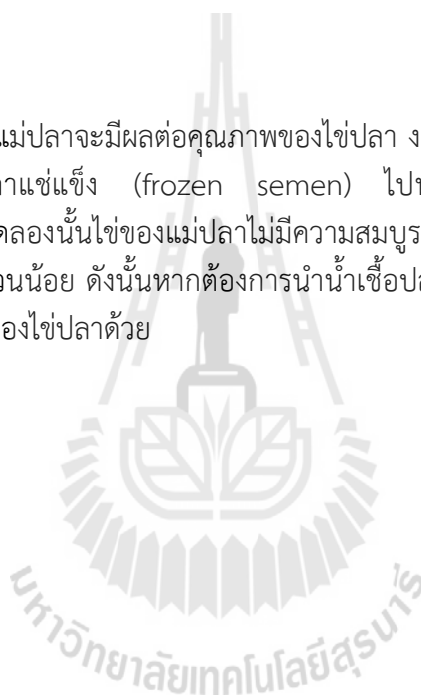
1. จากการศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant พบว่าการใช้ MC เป็นสาร extender ร่วมกับ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง

2. อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) ณ อุณหภูมิสุดท้าย (end point) ที่ -40°C ร่วมกับ MC+10% DMSO มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง

3. ภาชนะบรรจุ แบบ Straw หรือ cryovial ขนาดต่างๆ ไม่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง ดังนั้นสามารถเลือกใช้ภาชนะบรรจุตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการได้

ข้อเสนอแนะ

ความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่ปลาจะมีผลต่อคุณภาพของไข่ปลา งานวิจัยในครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็ง (frozen semen) ไปทดสอบกับไข่ของแม่ปลากระโทง เนื่องจากช่วงเวลาที่ทำการทดลองนั้นไข่ของแม่ปลาไม่มีความสมบูรณ์พันธุ์จึงส่งผลให้การผสมติดต่ำ อีกทั้งจำนวนของแม่ปลามีจำนวนน้อย ดังนั้นหากต้องการนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ไปใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมควรคำนึงถึงคุณภาพของไข่ปลาด้วย



เอกสารอ้างอิง

- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ วิจัย ศรีสุวรรณรัช สมศักดิ์ ล้วนปรีดา และ สุจินต์ หนูขวัญ 2529. การผสมเทียมปลากะโห้ในบ่อในบริเวณสวนจิตรลดา. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. 12 หน้า.
- Akcay, E., Bozkurt, Y., Secer, S. and Tekin, N. 2004. Cryopreservation of Mirror Carp Semen. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28: 837-843.
- Alvarez, B., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Cabrera, E., Pimentel, E. and Arenal, A. (2003). High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. Aquaculture Research. 220: 195-201.
- Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J. and Adamek, J. 1997. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture Research. 28: 567-571.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., and Demianowicz, W. 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. Theriogenology. 56: 177-192.
- Bart, A.N., Wolfe, D.F. and Dunham, R.A. 1998. Effects of cryoprotectant, sperm density and straw size on cryopreservation of blue catfish, *Ictalurus furcatus*, sperm. Transactions of the African Fisheries Society. 127(5): 819-824.
- Basavaraja, N. and Hegde, S.N. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post – thaw viability. Cryobiology. 49: 149-156.
- Baulny, B.O, Labbé, C. and Maisse, G. 1999. Membrane Integrity, Mitochondrial Activity, ATP Content, and Motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) Testicular Spermatozoa after Freezing with Different Cryoprotectants. Cryobiology. 39: 177-184.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R. and Herraes, M.P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture. 201: 301-314
- Chereguini, O., Banda, I., Rasines, I. and Fernandez, A. 2001. Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. Aquaculture Research. 32:133-143.
- Hambananda, A. 1996. Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi*

- Fowler. Ph.D. Dissertation, Kasetsart University, Thailand.
- Horvath, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research. 31: 317-324.
- Horvath, A., Miskolczi, E. and Urbanyi, B. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquat. Living Resour. 16: 457-460.
- Kainin, S., Ponchunchoovong, S., Imsilp, U. and Singsee, S. 2012. Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 spermatozoa. Aquaculture research. 1-9.
- Kwantong, S. and Bart, A.N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rates of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquaculture research. 34: 887-893.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., Weismann, T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology. 54: 1477-1498.
- Lahnsteiner, F., Berger, B. and Weismann, T. 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volum, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology. 60: 829-841.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research. 28: 247-479.
- Leung, L.K.P. 1991. Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Jaemison, B.G.M. (Eds.). Cambridge: University Press. London, p. 231-244.
- Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp, *Cyprinus carpio*: sperm Motility and Hatching success of Embryos. Cryobiology 41(3): 241-250.
- Linhart, O., Mims, S.D., Gomelsky, B., Cvetkova, L.I., Cosson, J., Rodina, M., Horvath, A., and Urbanyi, B. 2006. Effect of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in Paddlefish, *Polyodon spathula* frozen-thawed spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 22: 389-394.
- Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 14: 251-272.
- Nadesha, M.C. 1994. Fishes of the Mekong River-conservation and need for aquaculture. Reported from Naga. ICLARM Quarterly, 17(4): 17-18.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R. and Senhorini, J. A. 2006. Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxa Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). Brazilian Archives of Biology and Technology. 49: 651-659.

- Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta* m. lacustris L) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L). Aquaculture. 116: 275-285.
- Rana, K.J. 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Cryopreservation and Freezing-Drying protocols. Day, J.G., and McLellan, M.R. (Eds.). New Jersey: Humana press. 254 pp.
- Richardson, G.F., Miller, T.L. and McNiven, M.A. 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquaculture Research. 31: 307-315.
- Rodina, M., Gela, D., Kocour, M., Hadi Alavi S.M., Hulak M. and Linhart O. 2007. Cryopreservation of tench, *Tinca tinca*, sperm: Sperm motility and hatching success of embryos. Theriogenology. 67: 931-940
- Sukumasavin, N. 1996. Induced spawning of giant carp, *Catlocarprio siamensis*, from the brood stock permanently reared in earthen pond. Thai Fisheries Gazette. 49(1): 23-26.
- Thorgaard, G.H., Pual, A., Wheeler and Robert D.F. 2000. Utilization of androgenesis for strain recovery from cryopreserved sperm. In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, 305-309.
- Urbanyi, B., Horvath, A., Varga, Z., Horvath, L., Magyary, I. and Radics, F. 1999. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research. 30(2): 145-151.
- Velasco-Santamaria, Y. M., Medina-Robles, V. M. and Cruz- Casallas, P. E. 2006. Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture. 256: 264 - 271.
- Viveiros, A. T. M., Lock, E., Woelders, J. H. and Komen, J. 2001. Influence of Cooling rates and Plunging Temperatures in an Interrupted Slow-Freezing Procedure for semen of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiology. 43: 276-287.
- Viveiros, A. T. M., So, N., and Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: Cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. Theriogenology. 54: 1395-1408.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009. Cryopreservation of red Snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology. 72(1): 129-138.

- Warnecke, D., and Pluta, H. J. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture Research. 215: 167-185.
- Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society. Baton Rouge, Louisiana, 264-275.
- Yohana, M.V., Victor, M.M. and Pablo, E. C. 2006. Cryopreservation of yamu (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture. 256: 264-271.
- Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J. and Chen, S.L. 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. Theriogenology. 63: 763-773.



ภาคผนวก
ตารางแสดงผลการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์

1. การศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระโทงโดยการแช่แข็ง

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	16532.1428571	6	2755.357143	13.61	0.0001
Within Groups	7087.5000000	35	202.5		
Total	23619.6428571	41			

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMA) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	16950.0000000	6	2825.00	12.74	0.00001
Within Groups	7762.5000000	35	221.7857143		
Total	24712.5000000	41			

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	18064.2857143	6	3010.714286	13.25	0.00001
Within Groups	7950.0000000	35	227.1428571		
Total	26014.2857143	41			

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	Df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2733.23076190	6	455.5384603	6.35	0.0001
Within Groups	2511.02385000	35	71.74353857		
Total	5244.25461190	41			

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMA) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	Df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2379.51709048	6	396.5861817	3.79	0.0051
Within Groups	3659.42896667	35	104.5551133		
Total	6038.94605714	41			

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	3400.08046190	6	566.680077	5.82	0.0003
Within Groups	3409.33010000	35	97.40943143		
Total	6809.41056190	41			

1.3 อัตราการปฏิสนธิ

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2130.241	6	355.040	48.737	0.000
Within Groups	203.977	28	7.285		
Total	2334.218	34			

ตารางที่ 8 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (DMA) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2060.169	6	343.362	42.620	0.000
Within Groups	225.575	28	8.056		
Total	2285.745	34			

ตารางที่ 9 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของการศึกษาชนิดของสาร extender (MC และ HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20%

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	760.629	6	126.771	10.501	0.000
Within Groups	338.027	28	12.072		
Total	1098.655	34			

2. การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	28240.385	12	2353.365	15.750	0.000
Within Groups	9712.500	65	149.423		
Total	37952.885	77			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant ร่วมกับสาร Extender (10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS) โดยทำการศึกษ้อัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ ได้แก่ -40 , -60 และ -80°C

ตารางที่ 11 การวิเคราะห์หาแนวโน้มผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการมีชีวิตในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	8049.953	12	670.829	33.673	0.000
Within Groups	1294.909	65	19.922		
Total	9344.861	77			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant ร่วมกับสาร Extender (10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS) โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ ได้แก่ -40 , -60 และ -80°C

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์หาแนวโน้มผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการปฏิสนธิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	3555.009	12	296.251	28.867	0.000
Within Groups	400.240	39	10.263		
Total	3955.248	51			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant ร่วมกับสาร Extender (10% DMSO ร่วมกับ MC และ 10% DMA ร่วมกับ HBSS) โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) และ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) ร่วมกับอุณหภูมิสุดท้าย (Endpoint) 3 ระดับ ได้แก่ -40 , -60 และ -80°C

3. ผลของ straw size ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีแช่แข็ง

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ straw size ที่มีขนาด 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 ml ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	900.000	5	180.000	0.857	0.521
Within Groups	6300.000	30	210.000		
Total	7200.000	35			

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ straw size ที่มีขนาด 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 ml ต่ออัตราการมีชีวิตในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	119.669	5	23.934	3.019	0.025
Within Groups	237.851	30	7.928		
Total	357.520	35			

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของ straw size ที่มีขนาด 0.25, 0.5, 1, 2 และ 5 ml ต่ออัตราการปฏิสนธิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโท้โดยวิธีแช่แข็ง

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	544.536	5	108.907	11.645	0.000
Within Groups	224.455	24	9.352		
Total	768.991	29			

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์
(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong
เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9201 00947 09 0
2. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000
Tel: (044) 224377-8
Fax: (044) 224150
E-mail: samorn@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา:

Degree	Institution	Year	Country
B.Sc. (Biology)	Prince of Songkhla University	1992	Thailand
M.Sc. (Zoology)	Chulalongkorn University	1995	Thailand
Ph.D (Aquaculture)	Asian Institute of Technology	2003	Thailand

5. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

- Cryopreservation of fish sperm
- Aquaculture (seed production)

6. ผลงานวิจัย

สมร ขวัญทอง. 2540. การกระจายของแมลงกินได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 4: 211-217.

สมร ขวัญทอง และ สุรลักษณ์ รอดทอง. 2545. รายงานการวิจัย การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนาในสกุล *Esanthelphusa*, ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส 50 หน้า.

สมร พรชื่นชูวงศ์. 2547. รายงานการวิจัย การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาซวายโดยวิธีการแช่แข็ง 47 หน้า.

Kwantong S. and Bart, A. N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rates of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquaculture research*, 34: 887-893.

- Samorn Kwantong** and Sureelak Rodtong. 2004. Species identification of Thai rice-field crab using stereomicroscopy and scanning electron microscopy. 8 th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 83.
- Sureelak Rodtong and **Samorn Kwantong**. 2004. Scanning electron microscopy and nucleic acid technique aid the identification and diversity study of Thai rice-field crab. 8 th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 122.
- Samorn Kwantong** and Bart, A. N. 2004. Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. International symposium on animal and plant production for food and environmental security. August 9-11, 2004, Chaophya park hotel, Bangkok. Thailand. P. 105-109.
- Kwantong S.** and Bart, A. N. 2006. Cryopreservation of black eared catfish, *A. Pangasius larnaudii* sperm. *Aquaculture research*, 37: 955-957.
- Pongchunchoovong, S.** 2006. Species identification of Thai rice-field crab in the lower north-eastern region of Thailand. ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง) ครั้งที่ 44 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549. หน้า 400-406. (Oral presentation).
- Ponchunchoovong, S.** 2006. Species identification of Thai rice-field crab in the lower north-eastern region of Thailand. *Suranaree J. Sci. Technol.* 13(3): 245-249.
- สมร พรชื่นชูวงศ์ สุพรรณ ชันน้ำเที่ยง สุรัชย์ ภาสตา สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์ นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ และ นฤพล สุขุมาสวิน. 2550. ผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสาวยโดยวิธีการแช่แข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 1 เล่มที่ 1: 11-22.
- Ponchunchoovong, S.** 2007. Effects of equilibration times on the fertilization rate of cryopreserved striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. First international conference on sustainable animal agriculture in developing countries. 27-29 September, Guandu Hotel, Kunming, China. P. 341-344.
- Ponchunchoovong, S.** 2008. Effects of freezing rates on the cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings "The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008, Hanoi, Vietnam. P. 406.
- Kwantong, S.** and Bart, A. N. 2009. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). *Aquaculture Research*, 40: 292-297.

- Dokpong, D., **S. Ponchunchoovong**, U. Amsin, U. Piasoongnoen & S. Singhae. 2009. The effect of freezing Rates on the cryopreservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 268-270.
- Ponchunchoovong, S.** & S. Kannumteing. Effects of freezing rates on the cryopreservation of Black Eared catfish, *P. larnaudii* spermatozoa. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 271-273.
- Kainin, S., **S. Ponchunchoovong**, U. Imsin, U. Piasoongnoen & S. Singhae. Successful hybridization of *Pangasius* species using cryopreserved sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 274-275.
- Boonanuntanasarn, S., K. sukoim, T. Changmunwai, **S. Ponchunchoovong** & Y. Manakasem. Effect of *Butea superba* on masculinization of Nile tilapia. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 250-251.
- Nipon, S., R. Yahsiro, S. Tunkijjanukij and **S. Ponchunchoovong**. 2009. Preservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) Spermatozoa. Kasetsart University Fisheries research Bulletin Vol. 33(2): May, 2009. p. 12-23.
- Samorn, P.**, Augkana, J. and Tunyaluk, R. 2010. Effect of activators solution on motility and fertilization of frozen striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. Proceedings "The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 321.
- Samorn, P.**, Duangchan. D., Unnop, I., Uraiwan, P. and Sombut, S. 2010. **The effect of dilution ratios on short-term storage of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm.** Proceedings "The 14th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 322.
- Ponchunchoovong, S.** and Plime S. 2010. Effect of combinations of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of the spermatozoa of Striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44: 1153-1161.
- Ponchunchoovong, S.**, S. Kainin1, U. Imsilp, U. Piasoongnoen & S. Singsee. 2011. The effect of freezing rates and combinations cryodiluents on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.76.

Ponchunchoovong, S., D. Dokpong, U. Imsilp, U. Piasoongnoen & S. Singsee. 2011

Fertilization efficiency of fresh and frozen sperm from Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878). Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.75.

Boonmatun, T., **S. Ponchunchoovong**, T. Chomai , T. Vongpralub & A. Molee. 2011.

Effects of extender and storage time on motility of native chicken “Luang hang kao” spermatozoa. Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.336.

Vechklang, K., S. Boonanuntanasarn, **S. Ponchunchoovong**, N. Pirarat & C. Wanapu.

2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*. P. 1365-2095.

Ponchunchoovong, S., S. Kainin¹, U. Imsilp & U. Piasoongnoen. 2011. The effect of freezing procedures on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. World academy of science, engineering and technology. 24-26 August, 2011. Paris, France. P.1257-1261.

Samorn Ponchunchoovong. 2011. Cryopreservation of *Pangasius* spp. Spermatozoa. Germany. LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG. 65 pp.

Kainin, S. **Ponchunchoovong, S.,** U. Imsilp & S. Singsee. 2012. Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 spermatozoa. *Aquaculture research*: 1-9.

7. งานวิจัยที่สนใจ

Cryopreservation of fish spermatozoa
Aquaculture (seed production)

8. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 2 เรื่อง

1. การพัฒนาและเพิ่มผลผลิตปลาสวายโม่ง (Thai Panga) เพื่อการส่งออก (The improvement of Thai Panga production for export)
2. การใช้กากยีสต์แห้ง (dried brewer's yeast) และกากสาโท (rice wine residual) เป็นแหล่งโปรตีนเพื่อทดแทนการใช้ปลาป่นในอาหารปลาสวายโม่ง (Thai Panga)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอาคม ชุ่มธิ (MR. ARKOM CHOOMTHI)
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1006 00665 805
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชาการประมงชำนาญการพิเศษ
4. หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี
82 หมู่ที่ 1 ต. ม่วงชุม อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี 71110
โทรศัพท์ 0-34-611330 โทรสาร 0-34-613073
e-mail : kanchanaburi@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาและ สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
	อักษรย่อปริญญา	การศึกษา		
2532	ปริญญาตรี วท.บ. ประมง	ประมง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2540	ปริญญาโท M.Sc. Aquaculture	Aquaculture	Asian Institute of Technology	ไทย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา -
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่า
เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัยหรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. การเลี้ยงปลาหางนกยูงเพศผู้ที่ระดับความหนาแน่นต่างๆ
2. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปลากระดี่หม้อเผือกทอง
- 3 ผลของความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำต่อสัดส่วนลูกปลากัดจีนเพศผู้และอัตราความหนาแน่นในการอนุบาลลูกปลากัดจีน
4. การปรับปรุงคุณภาพปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata* Peter, 1859) โดยใช้รังควัตถุคาโรทีนอยด์จากธรรมชาติและสังเคราะห์
5. ชื่อผลงานวิจัย ต้นทุนการผลิตและผลตอบแทนการลงทุนเพาะเลี้ยงปลาทอง *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) ในภาคกลาง
6. การเพาะพันธุ์ปลาปอมปาดัวร์โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. สภาวะการประมงและผลจับสัตว์น้ำในอ่างเก็บน้ำเขื่อนก๊วลมจังหวัดลำปาง
2. ชีวิตวิทยาบางประการของปลารากกล้วยในแม่น้ำวังจังหวัดลำปาง
3. การศึกษาการเพาะพันธุ์ คัพภวิทยาและพัฒนาการของลูกปลารากกล้วยวัยอ่อน